

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- INLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

This Page Blank (uspto)

0/030621
PCT/JP 00/06100

JP 00/6100 日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

07.09.00

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月 7日

RECD 27 OCT 2000

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

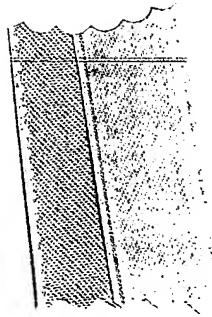
平成11年特許願第253443号

出願人
Applicant(s):

協和メデックス株式会社

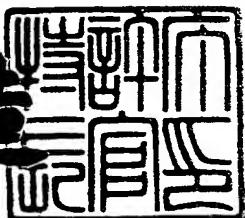
PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083132

【書類名】 特許願
【整理番号】 H11-059MQ3
【提出日】 平成11年 9月 7日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/02
G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600-1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 河野 弘明

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600-1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 橋本 百合子

【発明者】

【住所又は居所】 香川県木田郡三木町氷上1212-6

【氏名】 芳澤 宅實

【特許出願人】

【識別番号】 000162478

【氏名又は名称】 協和メデックス株式会社

【代表者】 岡 徹夫

【代理人】

【識別番号】 100106574

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008408

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 図面 1
【包括委任状番号】 9505337
【ブルーフの要否】 要

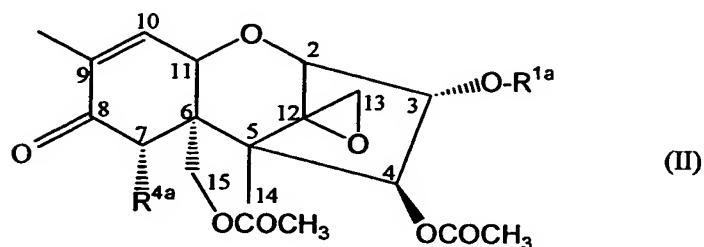
【書類名】 明細書

【発明の名称】 トリコテセン系マイコトキシン検出用試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(II)

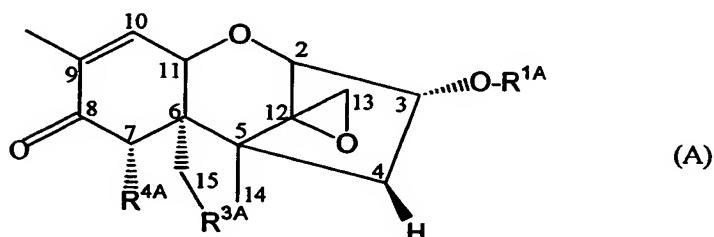
【化1】



(式中、 R^{1a} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{4a} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が R^{1a} が $COCH_3$ で R^{4a} がOHである上記式(II)で表される化合物1-1、 R^{1a} がHで R^{4a} がOHである上記式(II)で表される化合物1-2、 R^{1a} が $COCH_3$ で R^{4a} が $OCOCH_3$ である上記式(II)で表される化合物1-3の順で高く、

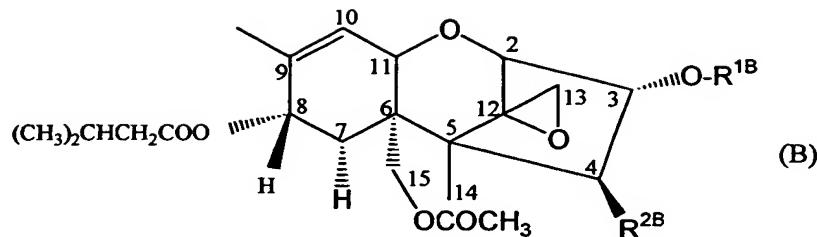
かつ式(A)

【化2】



(式中、 R^{1A} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{3A} および R^{4A} は同一または異なってOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物および式(B)

【化3】

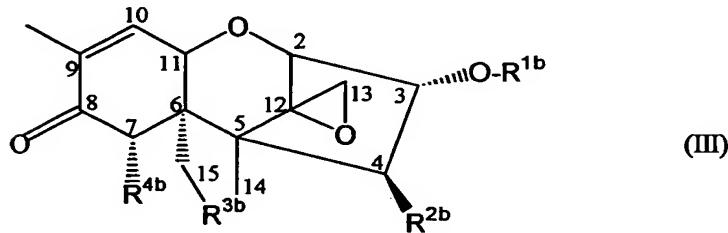


(式中、 R^{1B} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2B} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

【請求項2】 ハイブリドーマ細胞株K TM-205が生産する請求項1記載のモノクローナル抗体K TM-205。

【請求項3】 式(III)

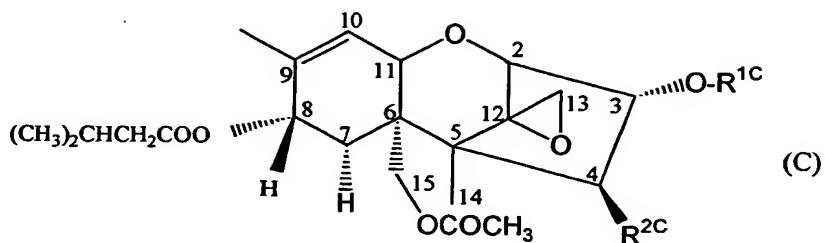
【化4】



(式中、 R^{1b} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2b} はH、OHまたは $OCOCH_3$ を表し、 R^{3b} および R^{4b} は同一または異なってOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が R^{1b} が $COCH_3$ で R^{2b} がHで R^{3b} が $OCOCH_3$ で R^{4b} がOHである上記式(III)で表される化合物2-1、 R^{1b} がHで R^{2b} がHで R^{3b} および R^{4b} が $OCOCH_3$ である上記式(III)で表される化合物2-2、 R^{1b} がHで R^{2b} および R^{3b} が $OCOCH_3$ で R^{4b} がOHである上記式(III)で表される化合物2-3の順で高く、

かつ式(C)

【化5】

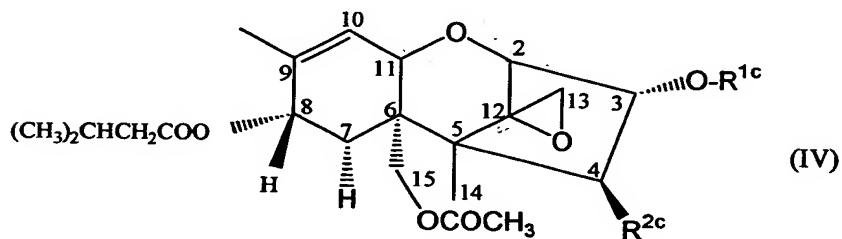


(式中、 R^{1c} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2c} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

【請求項4】 ハイブリドーマ細胞株K TM-240が生産する請求項3記載のモノクローナル抗体K TM-240。

【請求項5】 式(IV)

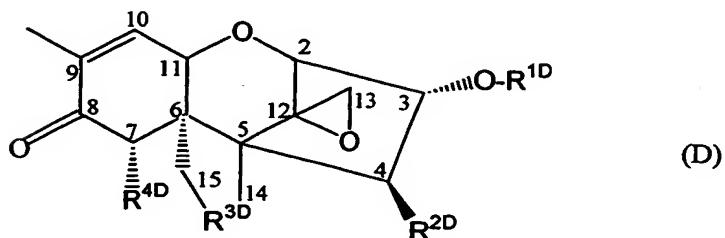
【化6】



(式中、 R^{1c} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2c} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が R^{1c} がHで R^{2c} が $OCOCH_3$ である上記式(IV)で表される化合物3-1、 R^{1c} がHで R^{2c} がOHである上記式(IV)で表される化合物3-2の順で高く、

かつ式(D)

【化7】



(式中、 R^{1D} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2D} および R^{4D} はH、OHまたは $OCOCH_3$ を表し、

R^{3D} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

【請求項6】ハイブリドーマ細胞株KTM-249が生産する請求項5記載のモノクローナル抗体KTM-249。

【請求項7】請求項1または2記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

【請求項8】請求項3または4記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

【請求項9】請求項5または6記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

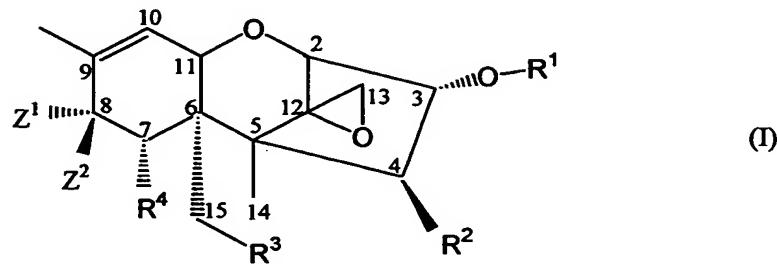
【請求項10】FERM BP-6835である請求項7記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項11】FERM BP-6836である請求項8記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項12】FERM BP-6837である請求項9記載のハイブリドーマ細胞。

【請求項13】式(I)

【化8】



(式中、 R^1 はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^2 、 R^3 および R^4 は同一または異なってH、OHまたは $OCOCH_3$ を表し、 Z^1 は $OCOCH_2CH(CH_3)_2$ を表し、 Z^2 はHを表すか、 Z^1 と Z^2 が一緒になって=Oを表す)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR(式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換し、か

つ3位の炭素にキャリアー物質を結合させた物質を、動物に投与して免疫させ、該免疫動物から採取される抗体産生細胞と永久増殖細胞とを融合させ、請求項1～6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を得ることを特徴とするハイブリドーマ細胞の製造方法。

【請求項14】 式(I)のR²がOCOCH₃である請求項13記載の製造方法。

【請求項15】 式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR（式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す）で表される基に変換した化合物の3位の炭素とキャリアー物質との結合が3位の置換基を架橋基とする結合である請求項13記載の製造方法。

【請求項16】 請求項13記載の式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR（式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す）で表される基に変換した化合物を有機溶媒以外の溶媒または有機溶媒を含んだ溶媒以外の溶媒に溶解したものをキャリアー物質と結合させる請求項13記載の製造方法。

【請求項17】 有機溶媒以外の溶媒または有機溶媒を含んだ溶媒以外の溶媒が水である請求項13記載の製造方法。

【請求項18】 マイコトキシンを含有する試料に請求項1～6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1つ以上作用させることを含む免疫学的方法により試料中マイコトキシンの定量を行う方法。

【請求項19】 少なくとも1つの水酸基を有する請求項13記載の式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR（式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す）で表される基に変換し、これに請求項1～6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1つ以上作用させることを含む免疫学的方法により試料中マイコトキシンの定量を行う方法。

【請求項20】 マイコトキシンがデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)およびT-2トキシン(T-2)からなる群から選ばれるもの

である請求項18記載の方法。

【請求項21】 請求項3または4記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18記載の方法により得られる定量値と請求項5または6記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18記載の方法により得られる定量値とを合算することによる、試料中DON, NIV、T-2およびそれらの誘導体の総量の定量方法。

【請求項22】 請求項1または2記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18記載の方法により試料中NIVまたはその誘導体を定量する方法。

【請求項23】 請求項3または4記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18の方法により得られる定量値からDON, NIVおよびそれらの誘導体を定量する方法。

【請求項24】 請求項3または4記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18の方法により得られる定量値と請求項1または2記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18の方法により得られる定量値との差から試料中のDONまたはその誘導体を定量する方法。

【請求項25】 請求項5または6記載のモノクローナル抗体を用いて請求項18記載の方法により試料中T-2またはその誘導体を定量する方法。

【請求項26】 免疫学的方法が、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイおよび発光イムノアッセイから選ばれる請求項18記載の方法。

【請求項27】 免疫学的方法が、競合法およびサンドイッチ法から選ばれる請求項18記載の方法。

【請求項28】 請求項1～6のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1種以上含む、マイコトキシンの免疫学的定量用試薬。

【請求項29】 ①検体前処理液〔請求項13記載の式(I)で表される化合物中の水酸基をOR(式中、Rは前記と同義である)で表される基に変換するための試薬〕、②検体希釈液、③定量用プレート、④請求項1～6のいずれかに記載のモノクローナル抗体、⑤2次用酵素標識抗マウス抗体、および⑥標準物質を含む請求項28項記載の免疫学的定量用試薬。

【請求項30】 請求項29記載の④請求項1～6のいずれかに記載のモノク

ローナル抗体および⑤2次用酵素標識抗マウス抗体に代えて、酵素標識抗マイコトキシン抗体液を用いる請求項29記載の免疫学的定量用試薬。

【請求項31】 請求項13記載の式(I)で表される化合物中の水酸基をOR(式中、Rは前記と同義である)で表される基に変換するための試薬と請求項1～6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1種以上含む試薬とからなるマイコトキシンの免疫学的定量用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食品や飼料に含まれるトリコテセン系マイコトキシンを免疫学的に定量する方法、定量用試薬、キットおよびそれらに使用するモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

マイコトキシンは、真菌によって生産される二次代謝産物で食品や飼料などを介して人畜になんらかの有害作用を示す化合物と定義され、細菌毒素などと区別されている。マイコトキシンは細菌毒素などと異なり低分子物質であり、多様な物質がこれまで知られている。その化学構造は多様であり、生体に対する有害作用も様々である。中には人体に入ると強い急性毒性を示すもの、また、発癌性、腎臓や肝臓に対する催腫瘍性が認められるものなど、人体にとって有害なものが少なくない。マイコトキシンは低分子物質であるがゆえ通常の食品加工、調理条件下では分解や除去が困難である。また、マイコトキシンは安定性が高く、飼料等を経て食用家畜に摂取された場合、その食肉中や乳製品などに残留し、最終的に人体に摂取され、毒性を示す。

【0003】

マイコトキシン汚染は様々なルートで発生するが、農作物栽培から収穫、貯蔵、加工の過程で真菌の侵入によって起こる一次汚染と、汚染飼料の給餌に伴う畜水産物(肉、乳、卵など)によって起こる二次汚染に大別される。一次汚染は農作物種(真菌の基質)、その栽培環境に棲息する真菌類、環境条件(気温、湿度

、降水量等)などの諸要因によって決まるため、地域的特性が認められる。

【0004】

麦類やトウモロコシなどの主要穀物を汚染する代表的なマイコトキシンとしてトリコテセン系マイコトキシンがあげられる。代表的なトリコテセン系マイコトキシンとしてはデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)、T-2トキシン(T-2)がある。それらの主たる生産菌であるF.graminearum, F.culmorum, F.sporotrichioidesは土壤中に常在し、気温、湿度、降水量などの自然条件が満たされれば容易に作物に感染し、作物のマイコトキシン汚染が広がる。

【0005】

食品汚染、飼料汚染を防止する目的でトリコテセン系マイコトキシンについては世界各国で食品や飼料中の残留濃度等に規制が設けられている。従って、食品や飼料中のトリコテセン系マイコトキシンを迅速かつ正確に定量することは重要である。

従来のトリコテセン系マイコトキシン定量は、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、マススペクトロメトリー、動物を用いたバイオアッセイ、などを単独あるいはこれらの組み合わせで行われていた。さらに近年になって免疫学的定量法が考案され、使用されるに至っている。免疫学的定量法は、迅速、簡便でかつ特異性が高く、また感度の面でも大変すぐれた方法で、ホルモンや生体内物質の定量を始め様々な分野で広く応用されている。特にモノクローナル抗体取得技術が応用されるようになり、免疫学的定量法は飛躍的に進歩した。

【0006】

トリコテセン系マイコトキシンには多くの誘導体が存在し、かつそれら誘導体も毒性を有していることから、トリコテセン系マイコトキシンによる汚染状態を知るには、個々の誘導体を全て分別定量するのではなく、ある程度包括的に定量できることが望ましい。また、定量の対象となるものは麦、トウモロコシを中心とするトリコテセン系マイコトキシンに汚染された穀物、この穀物を食した家畜の肉や乳、さらこの肉や乳を加工した加工食品、汚染穀物を原料とした加工食品

等多岐に亘る。しかも加工されるに従って、マイコトキシン汚染は希釈されるので、低濃度のトリコテセン系マイコトキシンを定量する必要が在る。従って、感度の高い定量方法が望まれている。一方、トリコテセン系マイコトキシンはDON, NIV, T-2という3種に大別され、最低限この3種をそれぞれ分別定量することは、汚染された場所や状況を知る上で重要なことである。このような需要に合ったトリコテセン系マイコトキシンの免疫学的定量法を構築する場合には、目的物質に対し親和性が高く、かつ特異性の高い抗体、特にモノクローナル抗体を入手することが必要である。トリコテセン系マイコトキシンに対するモノクローナル抗体の取得は種々行われてきた。特公平5-43358にはT-2とキャリアー蛋白とを結合させた免疫原を用いてマウスを免疫し、T-2に特異的に反応するモノクローナル抗体およびこの抗体を用いたT-2類の測定法が開示されている。Dietrichらは同じく、T-2に対するモノクローナル抗体や3位がアセチル化したDONに対するモノクローナル抗体の取得に成功している (Natural Toxins 3:288-293 1995)。また、USP4879248には8位の置換基を架橋基に利用してキャリアータンパク質を結合させて抗体を取得することが開示されている。しかし親和性が高く、かつ目的にあった特異性を持ったモノクローナル抗体は開示されていない。3位の炭素にキャリアータンパク質を結合させた物質を免疫原とした4, 15-diacetyl nivalenolに対するポリクローナル抗体は、Applied and Environmental Microbiology, May 1993, p.1264-1268に開示されている。さらにFood Addit. Contam., 5:629 (1988) やJ. Agric. Food Chem., 36:663 (1988)にもT-2やDONに対するモノクローナル抗体が開示されている。

【0007】

本願発明によるモノクローナル抗体は下記の特徴により上記公知のモノクローナル抗体より優れている。

KTM-249はDietrichら (Natural Toxins, 3:288(1995)) の抗体 (3E2) に比較し、親和性が顕著に高いために、検出系でのT-2の検出限界が0.0001ng/mL程度と高感度になる。またKTM-249はacetyl-T-2やHT-2にもT-2と同程度の反応性を示し、本発明の目的にかなった抗体である。

【0008】

K TM-240はDietrichら (Natural Toxins,3:288(1995)) の抗体 (5B2) とは反応性が明らかに異なり、例えば5B2はdiacetyl-DONに対する反応性は3-acetyl-DONの6倍程度、またtriacetyl-DONに対する反応性は3-acetyl-DONより弱いのに対し、K TM-240はdiacetyl-DONに対する反応性は3-acetyl-DONの約50倍、またtriacetyl-DONに対する反応性も3-acetyl-DONの2倍ある。またK TM-240はnivalenolのアセチル体とも強い反応性を示すのに対し、5B2にはこれら化合物との反応性はなく、従ってDONとNIVとを同時に検出する目的には使用できない。

【0009】

特公平5-43358記載のモノクローナル抗体はHT-2との交差反応性が約3%なのに対し、K TM-249はHT-2、T-2さらにはacetyl-T-2とも同程度の反応性を示し、T-2関連トキシンを一括して測定するという本発明の目的にかなった抗体である。

Chibaら (Food Addit Contam,5:629(1988)) の抗体は、HT-2との反応性はT-2の0.5%以下だが、本発明のK TM-249はHT-2とも強く反応する。

【0010】

Casaleら (J.Agric.Food Chem.,36:663(1988)) の抗体DON-1と本発明のK TM-240とは明らかに反応性が異なる。DON-1は3-acetyl-DONと強く反応し、DONとも良く反応し、nivalenolとも弱いが反応し、一方15-acetyl-DONとは反応しない。本発明のK TM-240はDONやnivalenolとは反応しないが、diacetyl-DONやtriacetyl-nivalenolと強く反応する。15-acetyl-DONに対する反応性もあり、しかも3-acetyl-DONに対する反応性よりも強い。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

トリコテセン系マイコトキシンの免疫学的定量法構築のためには、多くの誘導体が存在するトリコテセン系マイコトキシンを包括的に定量でき、かつDON、NIV、T-2という3種に大別して定量できる特異性を持ち、しかも低濃度の抗原を定量する必要から親和性の高い抗体が要求される。しかも目的とする抗

体は、生産の容易さや再現性の高さ、特異性の均一さ等からモノクローナル抗体が望ましい。

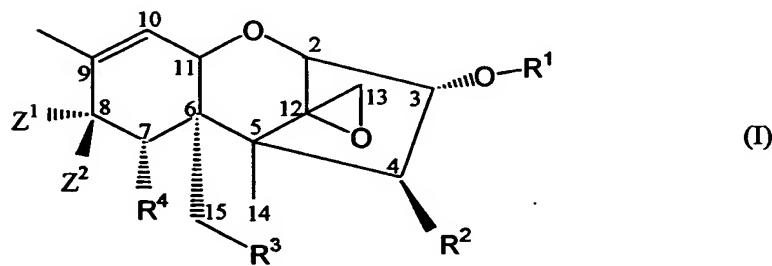
【0012】

【課題を解決するための手段】

トリコテセン系マイコトキシンはいわゆるハプテンと呼ばれる低分子物質で、それ単独では免疫原性が低い。従って、マイコトキシンに対する抗体を作製する場合は、マイコトキシンをキャリアー物質に結合させるなど生体にとって抗原と認識される形にしてから免疫する必要がある。本発明者はこのキャリアー物質とマイコトキシンとの結合部位の違いにより得られる抗体の親和性や特異性が影響を受けることに注目した。トリコテセン系マイコトキシンは水に対し難溶性の為、一般的にトリコテセン系マイコトキシンを溶解する際、有機溶媒が用いられてきた。本発明者は有機溶媒を含まない水溶液を用いてトリコテセン系マイコトキシンを溶解し、キャリアー物質と結合させ、式(I)

【0013】

【化9】



【0014】

(式中、R¹はHまたはCOCH₃を表し、R²、R³およびR⁴は同一または異なってH、OHまたはOCOCH₃を表し、Z¹はOCOCH₂CH(CH₃)₂を表し、Z²はHを表すか、Z¹とZ²が一緒になって=Oを表す)で表される化合物(以下、上述の式(I)で表される化合物を化合物(I)という)の3位の置換基を架橋基に利用してキャリアー物質を結合させ、この結合物を免疫原として用いることにより、親和性の非常に高い抗体を取得できることを見出した。

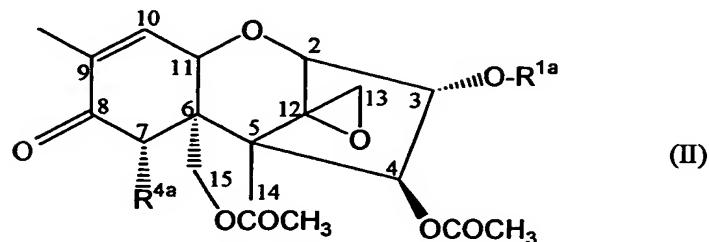
【0015】

さらにアシル化されたトリコテセン系マイコトキシンを免疫原に利用することで、特異性、親和性の高いモノクローナル抗体が取得できることも見いだした。

またさらに式(II)

【0016】

【化10】

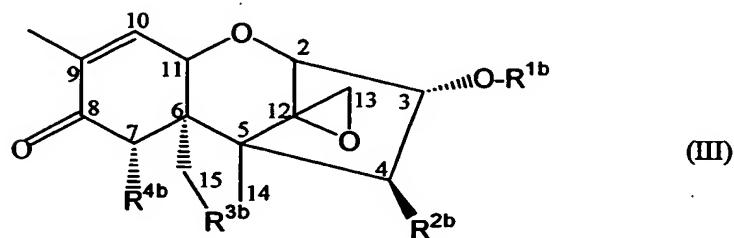


【0017】

(式中、 R^{1a} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{4a} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物 (以下、上述の式(II)で表される化合物を化合物(II)という) 、式(III)

【0018】

【化11】

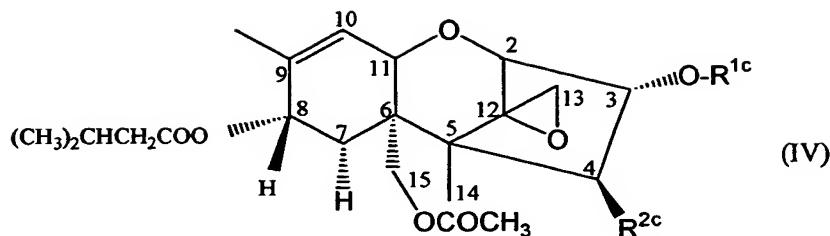


【0019】

(式中、 R^{1b} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2b} はH、OHまたは $OCOCH_3$ を表し、 R^{3b} および R^{4b} は同一または異なってOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物 (以下、上述の式(III)で表される化合物を化合物(III)という) および式(IV)

【0020】

【化12】



【0021】

(式中、 R^{1c} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2c} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す)で表される化合物(IV)に示す化合物にそれぞれ高い親和性を示すモノクローナル抗体を取得した。また化合物(I)中の水酸基をOR(式中、Rは低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換することにより、前記モノクローナル抗体を利用してマイコトキシンを一括定量することができ、また、DON、NIV、T-2という3種に大別して定量することも可能になることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

【0022】

なお、上述の各式中の定義において、低級アシル基は、直鎖もしくは分枝状の炭素数1～12のアルカノイル基を表す。具体的には、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、イソバレリル、ピバロイル、ヘキサノイル、ヘプタノイル、オクタノイル、デカノイル、ドデカノイルなどがあげられる。芳香族アシル基はベンゾイル、ナフトイルなどを表す。置換低級アシル基における置換基としては、ヒドロキシ、カルボキシなどがあげられる。置換芳香族アシル基における置換基としては、低級アルキル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、ハロゲン、カルボキシなどがあげられる。低級アルキルおよび低級アルコキシの低級アルキル部分は、直鎖もしくは分枝状の炭素数1～6の、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ベンチル、ヘキシルなどを表し、ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子を意味する。

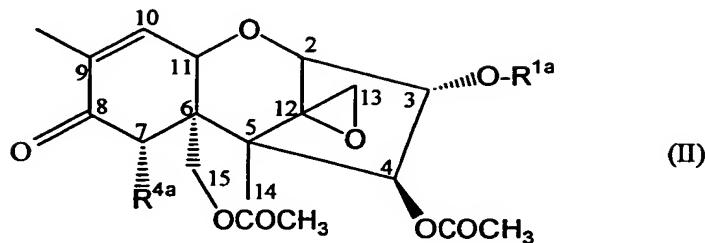
【0023】

本発明は以下の(1)～(31)に関するものである。

(1) 式(II)

【0024】

【化13】



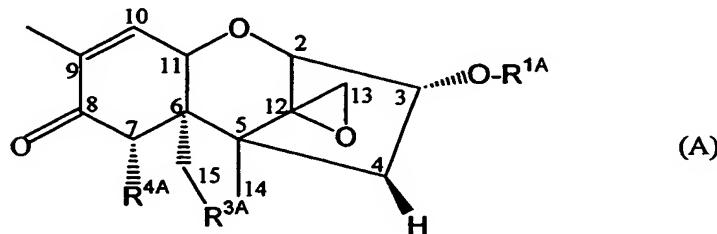
【0025】

(式中、R^{1a}はHまたはCOCH₃を表し、R^{4a}はOHまたはOCOCH₃を表す)で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度がR^{1a}がCOCH₃でR^{4a}がOHである上記式(II)で表される化合物1-1、R^{1a}がHでR^{4a}がOHである上記式(II)で表される化合物1-2、R^{1a}がCOCH₃でR^{4a}がOCOCH₃である上記式(II)で表される化合物1-3の順で高く、

かつ式(A)

【0026】

【化14】

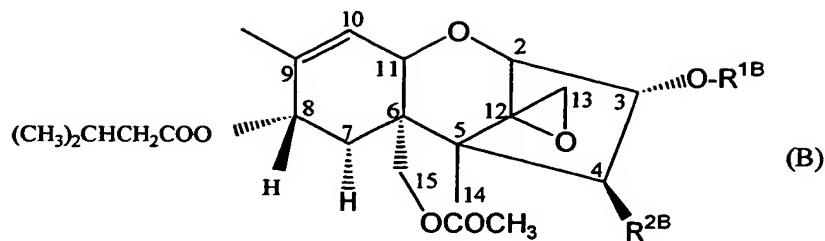


【0027】

(式中、R^{1a}はHまたはCOCH₃を表し、R^{3a}およびR^{4a}は同一または異なってOHまたはOCOCH₃を表す)で表される化合物および式(B)

【0028】

【化15】



【0029】

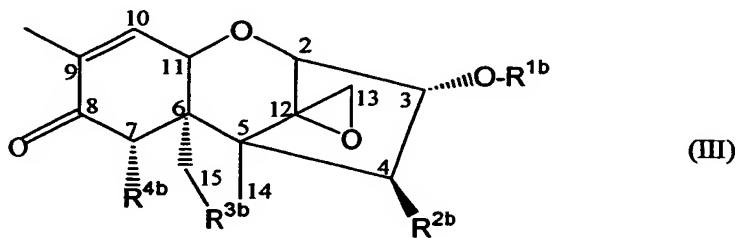
(式中、 R^{1B} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2B} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

(2) ハイブリドーマ細胞株K TM-205が生産する上記(1)記載のモノクローナル抗体K TM-205。

(3) 式(III)

【0030】

【化16】



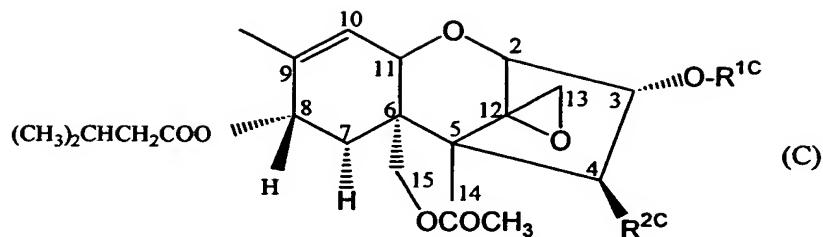
【0031】

(式中、 R^{1b} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2b} はH、OHまたは $OCOCH_3$ を表し、 R^{3b} および R^{4b} は同一または異なってOHまたは $OCOCH_3$ を表す)で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が R^{1b} が $COCH_3$ で R^{2b} がHで R^{3b} が $OCOCH_3$ で R^{4b} がOHである上記式(III)で表される化合物2-1、 R^{1b} がHで R^{2b} がHで R^{3b} および R^{4b} が $OCOCH_3$ である上記式(III)で表される化合物2-2、 R^{1b} がHで R^{2b} および R^{3b} が $OCOCH_3$ で R^{4b} がOHである上記式(III)で表される化合物2-3の順で高く、

かつ式(C)

【0032】

【化17】



【0033】

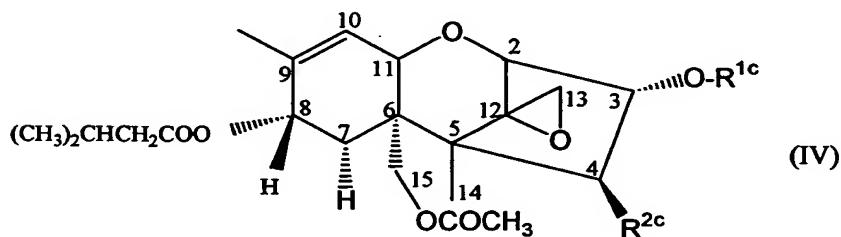
(式中、 R^{1c} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2c} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

(4) ハイブリドーマ細胞株K TM-240が生産する上記(3)記載のモノクローナル抗体K TM-240。

(5) 式(IV)

【0034】

【化18】



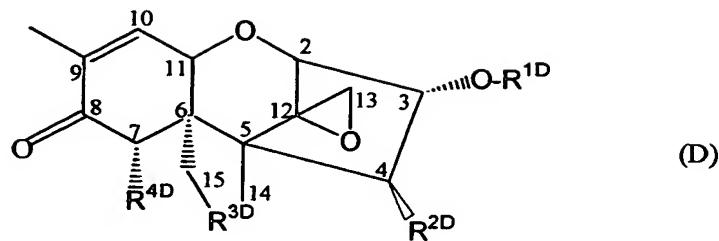
【0035】

(式中、 R^{1c} はHまたは $COCH_3$ を表し、 R^{2c} はOHまたは $OCOCH_3$ を表す) で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が R^{1c} がHで R^{2c} が $OCOCH_3$ である上記式(IV)で表される化合物3-1、 R^{1c} がHで R^{2c} がOHである上記式(IV)で表される化合物3-2の順で高く、

かつ式(D)

【0036】

【化19】



【0037】

(式中、R^{1D}はHまたはCOCH₃を表し、R^{2D}およびR^{4D}はH、OHまたはOCOCH₃を表し、R^{3D}はOHまたはOCOCH₃を表す)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体。

(6) ハイブリドーマ細胞株K TM-249が生産する上記(5)記載のモノクローナル抗体K TM-249。

(7) 上記(1)または(2)記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

(8) 上記(3)または(4)記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

【0038】

(9) 上記(5)または(6)記載のモノクローナル抗体を生産する能力を有するハイブリドーマ細胞。

(10) FERM BP-6835である上記(7)記載のハイブリドーマ細胞。

(11) FERM BP-6836である上記(8)記載のハイブリドーマ細胞。

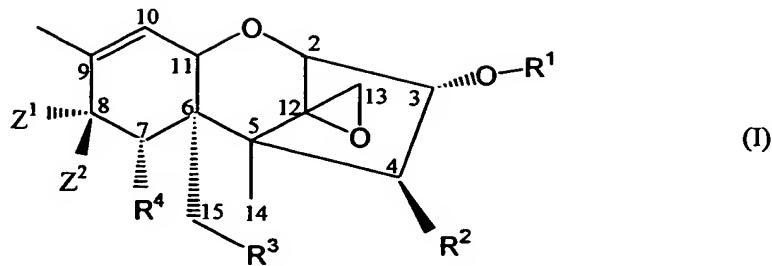
(12) FERM BP-6837である上記(9)記載のハイブリドーマ細胞。

【0039】

(13) 式(I)

【0040】

【化 2 0】



[0 0 4 1]

(式中、R¹はHまたはCOCH₃を表し、R²、R³およびR⁴は同一または異なってH、OHまたはOCOCH₃を表し、Z¹はOCOCH₂CH(CH₃)₂を表し、Z²はHを表すか、Z¹とZ²が一緒になって=Oを表す)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR (式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換し、かつ3位の炭素にキャリアー物質を結合させた物質を動物に投与して免疫させ、該免疫動物から採取される抗体産生細胞と永久増殖細胞とを融合させ、上記(1)～(6)項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を得ることを特徴とするハイブリドーマ細胞の製造方法。

[0 0 4 2]

(14) 式 (I) の R^2 が $OCOCH_3$ である上記(13)記載の製造方法。

(15) 式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR(式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換した化合物の3位の炭素とキャリアー物質との結合が3位の置換基を架橋基とする結合である上記(13)記載の製造方法。

(16) 上記(13)の式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR(式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換した化合物を有機溶媒以外の溶媒または有機溶媒を含んだ溶媒以外の溶媒に溶解したものをキャリアー物質と結合させる上記(13)記載の製造方法。

【0043】

(17) 有機溶媒以外の溶媒または有機溶媒を含んだ溶媒以外の溶媒が水である上記(13)記載の製造方法。

(18) マイコトキシンを含有する試料に上記(1)～(6)項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1つ以上作用させることを含む免疫学的方法により試料中マイコトキシンの定量を行う方法。

(19) 少なくとも1つの水酸基を有する上記(13)記載の式(I)で表される化合物のうち、少なくとも1つの分子において、少なくとも1つの水酸基をOR(式中、Rは置換もしくは非置換の低級アシル基、芳香族アシル基または置換芳香族アシル基を表す)で表される基に変換し、これに上記(1)～(6)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1つ以上作用させることを含む免疫学的方法により試料中マイコトキシンの定量を行う方法。

【0044】

(20) マイコトキシンがデオキシニバレノール(DON)、ニバレノール(NIV)およびT-2トキシン(T-2)からなる群から選ばれるものである上記(18)記載の方法。

(21) 上記(3)または(4)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)記載の方法により得られる定量値と上記(5)または(6)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)記載の方法により得られる定量値とを合算することによる、試料中DON、NIV、T-2およびそれらの誘導体の総量の定量方法。

(22) 上記(1)または(2)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)記載の方法により試料中NIVまたはその誘導体を定量する方法。

(23) 上記(3)または(4)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)の方法により得られる定量値からDON、NIVおよびそれらの誘導体を定量する方法。

【0045】

(24) 上記(3)または(4)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)の方法により得られる定量値と上記(1)または(2)記載のモノクローナ

ル抗体を用いて上記(18)の方法により得られる定量値との差から試料中のDONまたはその誘導体を定量する方法。

(25) 上記(5)または(6)記載のモノクローナル抗体を用いて上記(18)記載の方法により試料中T-2またはその誘導体を定量する方法。

(26) 免疫学的方法が、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイおよび発光イムノアッセイから選ばれる上記(18)記載の方法。

(27) 免疫学的方法が、競合法およびサンドイッチ法から選ばれる上記(18)記載の方法。

【0046】

(28) 上記(1)～(6)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1種以上含む、マイコトキシンの免疫学的定量用試薬。

(29) ①検体前処理液〔上記(13)記載の式(I)で表される化合物中の水酸基をOR(式中、Rは前記と同義である)で表される基に変換するための試薬〕、②検体希釈液、③定量用プレート、④上記(1)～(6)のいずれかに記載のモノクローナル抗体、⑤2次用酵素標識抗マウス抗体、および⑥標準物質を含む上記(28)記載の免疫学的定量用試薬。

(30) 上記(29)記載の④上記(1)～(6)のいずれかに記載のモノクローナル抗体および⑤2次用酵素標識抗マウス抗体に代えて、酵素標識抗マイコトキシン抗体液を用いる上記(29)記載の免疫学的定量用試薬。

(31) 上記(13)記載の式(I)で表される化合物中の水酸基をOR(式中、Rは前記と同義である)で表される基に変換するための試薬と上記(1)～(6)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を1種以上含む試薬とからなるマイコトキシンの免疫学的定量用キット。

【0047】

【発明の実施の形態】

本発明のトリコテセン系マイコトキシンに対するモノクローナル抗体の製造法について説明する。

モノクローナル抗体は、免疫原を免疫した動物から得られる抗体産生細胞と永

久増殖細胞たとえば骨髓細胞とを融合させてハイブリドーマ細胞を製造し、該ハイブリドーマ細胞を培養するか、動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

[0048]

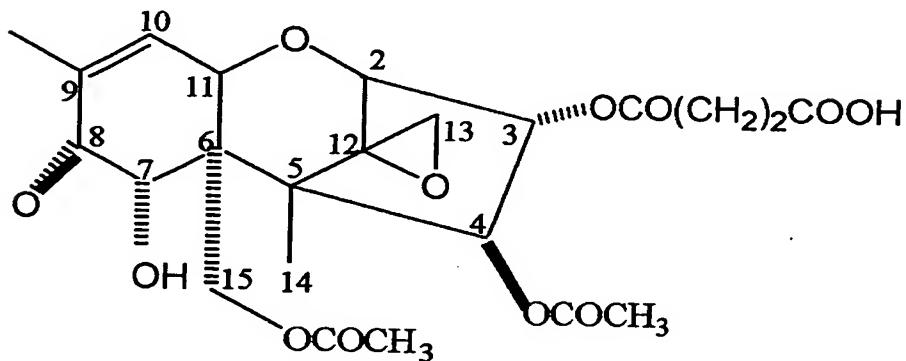
本発明の抗トリコテセン系マイコトキシンモノクローナル抗体を取得するためには、免疫用抗原を高分子担体に結合して得た複合体を免疫原とする必要である。免疫用抗原は、試料から精製によって取得しても良いし、化学合成方法によって取得しても構わない。この際のトリコテセン系マイコトキシンはアシル化したものを用いる。このアシル化トリコテセン系マイコトキシンの3位の置換基を架橋基に利用して高分子担体（キャリアー物質）と結合させ免疫原として用いる。

〔0049〕

免疫用抗原としては、上記式(I)で表される化合物中の水酸基をOR(式中、Rは前記と同義である)で表される基に変換した化合物、好ましくは式b-1

【0050】

【化 2 1】



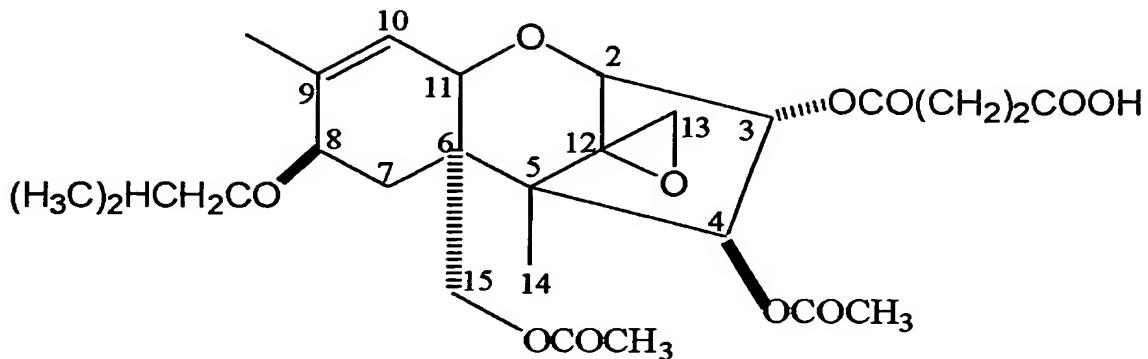
[0 0 5 1]

(以下、上述の化学式を式b-1と称す。)

または式 b - 2

[0052]

【化22】



【0053】

(以下、上述の化学式を式b-2と称す。)

で表される化合物が用いられる。

試料としては、F.graminearum、F.culmorum、F.sporotrichioidesなどの菌株を、適当な培地に接種後、室温付近で20日間程度培養し、この培養物から適当な方法で精製して得たものが使用できる。適当な培地とは、例えばポテトデキストロース培地のような市販の培地を用いてもよいし、精白米を蒸留水を加えて放置浸潤後、オートクレーブ滅菌して作製した培地を用いてもよい。また、精製方法としては、例えば培養物をアセトニトリル／水（3：1 v/v）などで抽出し、抽出物をフロリジル・無水硫酸ナトリウム重層カラムや、シリカゲル・無水硫酸ナトリウム重層カラムで精製する方法や、再結晶法による精製法が用いられる。また、実際にカビに汚染された穀物を出発材料として精製し採取しても構わない。精製法もTLCプレートを用いる方法、HPLC法を用いる方法等、色々な手段が取り得るが、目的物質が精製できれば特に限定するものではない。もちろん、試料として市販品を購入して用いてもよい。

【0054】

高分子担体は免疫用抗原のカルボキシル基、アミノ基、水酸基等と縮合反応を起こす反応基を有し、かつ免疫用抗原に連結されることにより該化合物に免疫原性を付与し得るか、該化合物が持つ免疫原性を高める高分子物質であればよい。具体的高分子物質としては、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、グロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、サイログロブリンなどの蛋白

質、デキストラン、セファロース等の多糖類、ポリスチレン、アクリルなどのラテックス粒子、ポリウリジル酸、ポリアラニル酸等のポリ核酸、MAP (multiple antigen peptide) などの合成高分子などがあげられる。トリコテセン系マイコトキシン誘導体にこれら高分子物質を結合させる方法としては、坂戸信夫、免疫実験操作法、151、右田俊介ら編、南江堂(1995)に記載のアミノ基を用いる方法 (カルボジイミド法、グルタルアルdehyド法、ジイソシアネート法)、カルボキシル基を用いる方法 (活性エステル法、混合酸無水物法、アシルアジド法)、SH基を用いる方法 (MBS法、SPDP法)、水酸基を用いる方法 (プロムシアン法、過ヨウ素酸酸化法) などが使用できる。この際、有機溶媒もしくは有機溶媒を含む溶液でトリコテセン系マイコトキシンを溶解せず水性媒体で溶解することが重要である。

【0055】

免疫原を免疫する動物としてはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリなどがあげられる。モノクローナル抗体作製にはマウス、ラット、ハムスター等を用いるのが好ましい。

免疫方法としては、西道、豊島、新生化学実験講座 1:389(1990)、東京化学同人等に記載の方法を用いて行うことができる。例えば免疫原をフロイントの完全または不完全アジュvantにエマルジョン化し、腹腔内、皮下、筋肉内等に投与することにより行われる。例えば、1回あたり 1.0 μg ~ 300 μg の免疫原を 7ないし 30 日、好ましくは 12ないし 16 日の一定間隔を置いて 2回以上好ましくは 2回~4回投与し、免疫を完成させることができる。

【0056】

抗体産生細胞の採取源としては免疫した動物の脾臓、リンパ節、末梢血液などが挙げられる。また免疫を行っていない動物の脾臓、リンパ節、末梢血液等より抗体産生担当細胞を取り出し、これら細胞に対し直接免疫を行って抗体産生細胞とする所謂 *in vitro* 免疫 (新井、太田、実験医学、6:43(1988)) を行った細胞を用いても構わない。

【0057】

抗体産生細胞と骨髄腫細胞との細胞融合を行う際使用する骨髄腫細胞に特に限

定はないが、抗体産生細胞と同種の動物由来の細胞株を使用するのが好ましい。また適切に細胞融合が行われた細胞のみを効率よく選択するために、特定の薬物マーカーを有するものが好ましい。例えば8-アザグアニン耐性の骨髓腫細胞はヒポキサンチン、アミノブテリン、およびチミジンを含有した培地（HAT培地）中では生育できないが、この細胞と正常細胞とが融合した細胞はHAT培地中で生育できるようになり、未融合の骨髓腫細胞と区別できることから好んで使用される。具体的にはP3×63-Ag. 8. 653やP3×63-Ag. 8. U 1、Sp/O-Ag 14などが挙げられる。

【0058】

細胞融合はKhlerとMilstein (Nature, 256:495(1975)) によって発明され、急速に発展し、様々に改良されてきた方法が応用できる。良く用いられる方法としては抗体産生細胞と骨髓腫細胞を10~3:1の割合で混合し、30~50%のポリエチレングリコール（平均分子量1500~6000）を融合剤に用いて処理する方法がある。また電気パルスによる融合も行われることがある（大河内ら、実験医学、6:50(1988)）。

【0059】

細胞融合を終えた細胞は選択培地に浮遊させ、96ウェル培養プレートのような目的細胞選択に有利な培養容器を用いて融合細胞のみを生育させる。融合細胞のみが選択的に生育された段階で、目的物質に対する抗体を産生している細胞のみを選択する。この選択は融合細胞の培養上清中の目的抗体の有無を、例えばエンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセイなどの方法を用いて調べて行う。選択された細胞をたとえば限界希釈法や軟寒天培地法などを用いて単クローナル化し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株を得る。

【0060】

モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞株を適当な培地で培養してその培養液を回収し、あるいは細胞株を動物の腹腔内に移植して腹水中で増殖させて腹水を回収し、それら培養液または腹水から得ることができる。培養液あるいは腹水中の抗体は必要に応じて精製して使用することができる。精製方法としては例えば硫酸アンモニウムを用いた塩析分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲ

ル濾過カラムクロマトグラフィー法、プロテインAやプロテインGを用いたアフィニティカラムクロマトグラフィー法、抗原を固相化したゲルを用いるアフィニティカラムクロマトグラフィー法などの方法が単独または組み合わせて用いられる。

【0061】

上記方法により、抗トリコテセン系マイコトキシンモノクローナル抗体を得ることができる。得られる具体的なモノクローナル抗体としては、KTM-205、KTM-240およびKTM-249と名づけたモノクローナル抗体があげられる。モノクローナル抗体KTM-205は、式(II)で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が化合物1-1、1-2および1-3で表される化合物の順で高く、かつ式(A)または(B)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体KTM-240は、式(III)で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が化合物2-1、2-2および2-3で表される化合物の順で高く、かつ式(C)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体であり、モノクローナル抗体KTM-249は、式(IV)で表される化合物に対し親和性を有し、その親和性の程度が化合物3-1および3-2で表される化合物の順で高く、かつ式(D)で表される化合物とは実質的に反応しないモノクローナル抗体である。

【0062】

本発明のトリコテセン系マイコトキシン誘導体に対する抗体を用いたマイコトキシンの定量方法は下記のとおりである。

本発明のモノクローナル抗体を用いることによってトリコテセン系マイコトキシンを免疫学的に定量することが可能である。免疫学的定量法としては標識物に放射性同位体を用いるラジオイムノアッセイ、酵素を用いるエンザイムイムノアッセイ、蛍光体を用いる蛍光イムノアッセイ、発光体を用いる発光イムノアッセイなど各種高感度免疫定量法があげられるが、これらに限定されるものではない。公知のほとんどの定量方法が適用可能であるが、競合法やサンドイッチ法がもっとも適合する方法である。これら方法には種々の変法があるが、例えば競合法では①抗体との結合を、標識された抗原と試料中あるいは標準物質中の抗原との

間で競合させる方法、②標識された抗体との結合を、液相試料中あるいは標準物質中の抗原と固相化された抗原との間で競合させる方法、③固相化抗体との結合を、標識された抗原と試料あるいは標準物質中の抗原との間で競合させる方法などがある。

【0063】

サンドイッチ法にはピーズ、チューブ、プレートなどの適当な固相に抗体を結合させた1次固相抗体と標準物質や試料中の抗原とを反応させ、次に固相抗体と結合した抗原と2次抗体とを反応させ、得られる固相抗体-抗原-2次抗体の3者複合体の形成をなんらかの方法で検出するのが一般的である。検出方法は2次抗体を種々物質で標識しておき、この標識物質を検出する方法が一般的で、標識物質として放射性同位体、酵素、蛍光体、発光体、金属などさまざまなもののが用いられる。これらの方法は溶液内に存在する抗原を測定するのに主に用いられている方法であるが、さらに組織中、細胞内、ニトロセルロース膜やナイロン膜上に存在するトリコテセン系マイコトキシンを定性的あるいは定量的に検出することも可能である。

【0064】

本発明の定量対象となる試料は、麦やトウモロコシのような穀物そのもの、これらを原料とした1次加工食品、さらに2次加工食品、ビールやマイコトキシンによって汚染された飲料水のような液体試料等様々なものがある。液体試料を除き、ほとんどの試料は固体物であることから、定量対象からトキシンを抽出して回収し、通常免疫学的定量法において扱い易い液体試料とする工程が含まれることが多い。本発明においても、採取した試料を最終的には本発明の試薬組成物で定量可能な状態にする必要があり、通常これを前処理と呼んでいる。用いる抗体の特異性に合わせて、もっとも目的に適った前処理方法をとらねばならない。本発明の新規定量試薬ではこの前処理工程で、トリコテセン系マイコトキシン誘導体の一部を別の誘導体に変換する工程を含んでいる。変換する方法は部分アセチル化が最も好適な方法のひとつである。

【0065】

アセチル化は一般的には化合物に適当な溶媒を加えて溶解し、無水酢酸および

塩基を加えて反応させることにより行われる。溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルムなどのハロゲン系有機溶媒や、ジエチルエーテル、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジクロロメタンなどの無水酢酸とは反応しない一般的な溶媒が用いられる。塩基としては、ピリジン、トリエチルアミンなどの有機塩基、重曹、炭酸カリウムなどの無機塩基を用いることが出来る。このうち、ピリジンは塩基と溶媒とを兼ねることが出来るので好適である。

【0066】

部分アセチル化において目的の部位のみをアセチル化するためには、無水酢酸の濃度、反応温度および反応時間を調整することが必要となる。また、その際にには、アセチル化の前に試料を十分に乾固させ、反応温度は高温にならないこと、さらには一定温度に保って反応させ、かつ反応時間も一定にするのが望ましい。さらに、反応を規定の時間以上に反応させないためには反応を適当な時間後終了させる必要がある。

【0067】

無水酢酸の濃度は、乾固物の重量に対し、0.1倍から10000倍、好ましくは0.5から10倍程度であるが、加える有機溶媒量に応じて調節が必要である。

反応温度は氷冷下から用いた溶媒の沸点まで用いることができるが、好ましくは30℃から50℃程度、特に45℃が好ましい。ただし、これらアセチル化条件は目的を達し得るのであれば、特に限定する必要はない。

【0068】

反応時間は反応開始後直ちに終了させてもよく、場合によっては1週間程度でもよいが、操作性を考慮すれば1時間以内が好ましい。反応終了の手段としては、塩基と酢酸を除去する方法、またはアルカリを添加して反応を終了させる方法のいずれでもよい。塩基と無水酢酸は直ちに揮発させることにより、除去することができる。添加するアルカリとしては、重曹水が好ましい。

【0069】

代表的な例としては、乾固した試料が20mgにピリジン50μLと無水酢酸

を25μL加え、反応温度45℃で反応させる場合、45分間程度が好ましい。

ただし、これらアセチル化条件は目的を達し得るのであれば、特に限定する必要はない。

また、以上のアセチル化の工程はいかなるアシル化にも応用することができる

【0070】

【実施例】

以下、本発明を実施例を用いて説明する。

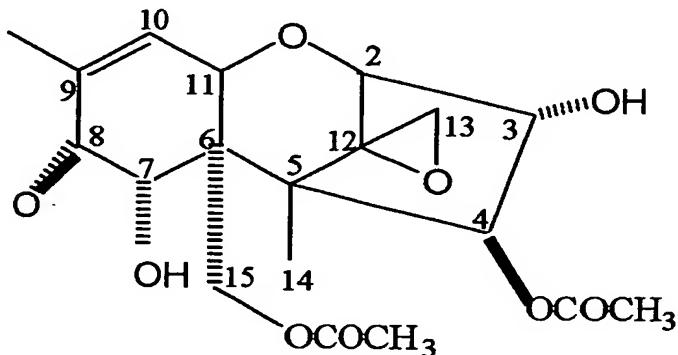
実施例1 (モノクローナル抗体の製造)

a) 各種化合物

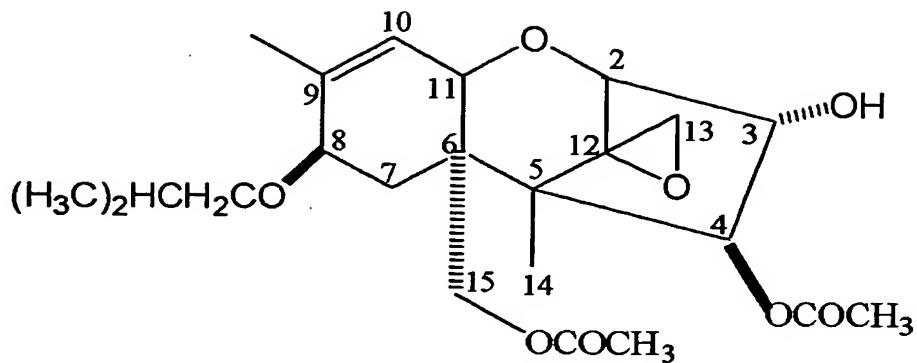
式a-1

【0071】

【化23】



【化24】



【0074】

(以下、上述の化学式を式a-2と称す。)

の化合物はシグマ社製のT4887を用いた。

b) 免疫用抗原の調製

式a (式a-1:4, 15-di-O-acetyl-nivalenol, 式a-2: T-2) の化合物 50 mg を 7 mL 容のねじ栓付試験管にとり、乾燥ピリジン 1 mL と酸無水物 35 mg を加えた後、Metal Block Bath (ヤマト科学(株)、YH-121) で 100°C、3 時間反応させた。反応物を濃縮乾固してピリジンを除去し、クロロホルム 4 mL を加えて水洗 (1 mL × 4 回) した後、クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られる溶液をシリカゲル薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) にかけ、式b (式b-1: 4,5-di-O-acetyl-nivalenol 3-hemiisuccinate, 式b-2: T-2 3-hemiisuccinate) の化合物の存在を確認した後、この溶液を減圧下濃縮乾固した。

【0075】

式b (式b-1, b-2) の化合物を含む上記濃縮乾固物 0.5 mg を、140 mM NaCl を含む 50 μL の 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 (以下 PBS と略記する) に溶解した。溶解を助けるため、上記緩衝液に Triton X-100 を 0.01% 加え、さらにプローブ型の超音波発生装置 (モデルUR-200P、トミー精工社) で溶解を補助した。溶解液をキーホールリンペットヘモシアニン (以下KLHと略記する) 水溶液 (20 mg/mL) 0.5 mL と混合した。混合液の pH を 7.5 に合わせた後、20 mg の EDC [1-エチル-

3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド]を加え、室温で6時間反応させた。反応終了後PBSに対し透析をおこない、透析物をトリコテセン系マイコトキシン誘導体(式b-1)-KLH水溶液およびトリコテセン系マイコトキシン誘導体(式b-2)-KLH水溶液とした。水溶液中のタンパク質濃度をウシ血清アルブミン(以下BSAと略記する)をスタンダードとしてLowry法タンパク質定量試薬キット(Bio-Rad社)で定量した。KLHに代えてBSAを用いる以外は、上記と同様の方法でトリコテセン系マイコトキシン誘導体(式b-1)-BSAコンジュゲート溶液およびトリコテセン系マイコトキシン誘導体(式b-2)-BSAコンジュゲート溶液も調製した。

c) モノクローナル抗体の調製

6週令の雄Ba1b/cマウスの背中皮下にフロイントの完全アジュバントと等量混合したトリコテセン系マイコトキシン(式b-1または式b-2)-KLHを0.1mg/匹投与した。以後該等量混合物0.1mg/匹を背中皮下に3週間毎に2回投与し、その3週間後、尾静脈よりPBSに溶解したトリコテセン系マイコトキシン(式b-1又は式b-2)-KLHを0.1mg/匹投与し、3日後に抗体産生細胞を下記のとおり脾臓より採取した。

【0076】

免疫動物から脾臓を無菌的に摘出し、血清を含まないRPMI-1640培地(日本製薬)中にて解し、100メッシュの網を通過させて単独細胞化し、低張液中に懸濁し赤血球を溶解した後、血清を含まないRPMI-1640培地で3回遠心洗浄し抗体産生細胞を得た。

一方マウスミエローマ細胞P3U1を10%牛胎児血清(FCS)加RPMI-1640培地で培養して対数増殖期で細胞を回収し、血清を含まないRPMI-1640培地で3回遠心洗浄した。

【0077】

上記のとおり得られた抗体産生細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞P3U1懸濁液を10:1の比率で混合し、1200rpmで5分間遠心分離し、培養液を取り除いた。残った細胞に50%ポリエチレングリコール1500液(ベーリングー・マンハイム社)1mLをゆっくり加え、さらに血清を含まないRPMI-1

640培地50mLを徐々に加えてから1200rpmで5分間遠心分離して培地を取り除き、残った細胞をHAT培地(1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノブテリン、 2×10^{-5} Mチミジンを含む10%FCS加 RPMI-1640培地)に 1×10^6 細胞/mLとなるよう懸濁し、懸濁液を96ウェルマイクロタイタープレートに各ウェル200μLずつ分注した。細胞はこのままの状態で炭酸ガスインキュベーターにて5%炭酸ガスを含む空气中、37℃で培養した。10日後全ウェルにハイブリドーマのコロニーが観察された。

【0078】

目的抗体を産生している細胞を含むウェルを選択する目的で、下記のとおり培養上清中の抗体価をELISA法で定量した。96ウェルマイクロタイタープレートに50μLのトリコテセン系マイコトキシン誘導体(式b-1又は式b-2)-BSAコンジュゲート溶液(20μg/mL 0.1M炭酸緩衝液 pH 9.5)を分注し、4℃で一夜静置した。プレートをPBSで3回洗浄した後、1%BSA/PBS溶液250μLを分注して室温で1時間静置し、PBSで各ウェルを3回洗浄して反応用プレートとした。反応用プレートに0.1%のBSAを含むPBSで11倍に希釈した培養上清50μLを入れ、室温で3時間静置反応させた。反応終了後プレートを0.05%Tween20を含むPBSで5回洗浄した後、50μLのPOD標識-抗マウスイムノグロブリンズ-ウサギIgG(ダコ社)を加え、室温で1時間反応させた。反応後プレートを0.05%Tween20を含むPBSで5回洗浄した後、50μLのTMB発色試薬溶液(インターデン社)を加え、30分間室温で反応させ、最後に50μLの1mL/L硫酸水溶液を加え、マイクロプレートリーダー(MTP-120、コロナ電気)で450nmの吸光度を測定した。1.0以上の吸光度を示したウェルの細胞を選択した。

【0079】

クローニングは限界希釈法でおこなった。上記で得られたウェル内の細胞を 1×10^7 個/mLの胸腺細胞を含む10%FCS加RPMI-1640培地にて0.5個/mLになるよう希釈し、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに200μL分注し、5%炭酸ガスインキュベーターにて37℃で培養を行

った。培養開始10～14日後に各ウェルを観察し、生育コロニーが1個／ウェルのウェルを選び出し、その培養上清中抗体価を上記ELISA法にて定量し、目的抗体を產生している細胞株を含むウェルを選択した。さらに同様の操作を2回繰り返し、安定して目的抗体を產生するモノクローナル抗体產生細胞株を得た。得られた株が產生する抗体の免疫グロブリンクラスをモノクローナル抗体タイプキット（ザイメント社）を用い、培養上清中の抗体について同定し、產生抗体がIgG3またはIgMのものは除いた。

【0080】

8週令以上の雄Balb/cマウスの腹腔内に0.5mL/匹のプリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）を注入し、2週間飼育した。このマウスに 1×10^6 /匹のモノクローナル抗体產生細胞を腹腔内接種した。7～14日後、マウス腹腔に十分腹水が貯留した時点で、腹腔から18Gの注射針を用いて腹水を回収し、3000rpmで10分間遠心分離して上清を回収した。この上清を結合緩衝液（3M NaCl、1.5M グリシン pH 8.9）で3倍に希釈し、結合緩衝液で平衡化したプロテインAカラムに通液した。カラムをPBSで洗浄した後、50mMグリシン/HCl緩衝液（pH 2.5）で抗体を溶出した。溶出液は1M リン酸緩衝液（pH 7.5）で直ちに中性化した。回収した抗体液をPBSに対して十分透析を行い、精製モノクローナル抗体を含む液を得た。

実施例2 (抗体の特異性検討)

96ウェルマイクロタイプレート（ヌンク社）に50μLの実施例1で作製したトリコテセン系マイコトキシン（式b-1または式b-2）-BSAコンjugate溶液（20μg/mL 0.1M炭酸緩衝液 pH 9.5）を分注し、4℃で一夜静置した。プレートをPBSで3回洗浄した後、1%BSA/PBS溶液250μLを分注して室温で1時間静置し、PBSで各ウェルを3回洗浄して反応用プレートとした。該反応用プレートに、種々濃度の各種トリコテセン系マイコトキシン誘導体を加えた0.1%BSA加0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）または0.1%BSA加0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）のみ（コントロール：阻害0%）を50μL加え、これに、実施例1で取

得した抗体を0.1% B S A 加0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.4)で100ng/mLに希釈したものをプレートを攪拌しながら50μL分注、混合して4℃で一夜静置反応させた。反応終了後プレートを0.05% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した後、POD標識-抗マウスイムノグロブリンズ-ウサギIgGを50μL加え、室温で1時間反応させた。反応後プレートを0.05% Tween 20を含むPBSで5回洗浄した後、50μLのTMB発色溶液(インターデン社)を加え、30分間室温で反応させ、最後に50μLの反応停止液を加え、マイクロプレートリーダーで660nmの吸光度を測定した。各抗体の各種トリコテセン系マイコトキシンに対する反応性は、反応に用いた各種トリコテセン系マイコトキシンの濃度/吸光度曲線を作成し、コントロールの吸光度を100%としたときの、各種トリコテセン系マイコトキシン誘導体の反応阻害率から相対決定した。この結果をもとに、実施例1で確立したモノクローナル抗体産生株から目的に適ったものを選択し、それぞれの産生株および産生モノクローナル抗体をKTM-205、KTM-240、KTM-249と命名した。選択の基準は、実施例1で示した抗体産生株の内、KTM-205は式(II)で示す化合物による阻害が最も低濃度で得られ、かつ式(A)または(B)に示す化合物には実質阻害されないものを、KTM-240は式(III)で示す化合物による阻害が最も低濃度で得られ、かつ式(C)で示す化合物には実質阻害されないものを、またKTM-249は式(IV)で示す化合物による阻害が最も低濃度で得られ、かつ式(D)で示す化合物には実質阻害されないものとした。各抗体の特異性を表1に示した。

【0081】

これら抗体を生産するハイブリドーマ細胞はそれぞれKTM-205(FERM BP-6835)、KTM-240(FERM BP-6836)、KTM-249(FERM BP-6837)として、平成11年8月11日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目3番(郵便番号305-0046)に寄託されている。

【0082】

【表1】

表1. 各抗体の反応性

	KTM-205	KTM-240	KTM-249
nivalenol	—*	—	—
4-acetyl nivalenol	<0.01	—	—
3,4-diacetyl nivalenol	0.01	<0.01	—
4,15-diacetyl nivalenol	0.02	0.02	—
3,4,15-triacetyl nivalenol	1.00	1.00	—
4,7,15-triacetyl nivalenol	<0.01	—	—
3,4,7,15-tetracetyl nivalenol	<0.01	<0.01	—
deoxynivalenol	—	—	—
3-acetyl deoxynivalenol	—	—	—
15-acetyl deoxynivalenol	—	0.02	—
3,15-diacetyl deoxynivalenol	—	1.00	—
3,7,15-triacetyl deoxynivalenol	—	0.04	—
HT-2	—	—	1.00
T-2	—	—	1.00
acetyl T-2	—	—	0.78

注)

最も反応した物質との反応性を1とした時の相対反応性で表現した。

*: 実質的に反応性が確認出来ない

【0083】

実施例3 (試料中のトリコテセン系マイコトキシンの定量)

a) 定量用プレート

96 ウエルマイクロタイタープレートに $50 \mu\text{L}$ の実施例1で作製したトリコテセン系マイコトキシン (式b-1, 式b-2) - BSAコンジュゲート溶液 ($20 \mu\text{g/mL}$ 0.1M 炭酸緩衝液 pH 9.5) を分注し、4°Cで一夜静置した。プレートを PBS で3回洗浄した後、1% BSA/PBS溶液または1%スキムミルク/PBS $300 \mu\text{L}$ を分注して室温で1時間静置し、PBSで各ウェルを3回洗浄して反応用プレートとした。

【0084】

b) サンプル調製

収穫産地の異なる粉末ムギ (各々 10 g) にメタノール/水 (3:1, 40m

L) を加え、90分間時々攪拌しながら室温で静置して抽出した。抽出液を濾紙にて濾過し、濾液を回収した。濾液2mLに等量のメタノールを加え、4℃で4時間静置し、その後4℃、3000rpm、15分間遠心分離して上清を回収し、4℃に保存した。

保存溶液160μLを1mL容キャップ付きチューブに取り、気流下で濃縮、乾固し、さらに真空デシケータ内に一昼夜置き、完全に乾固させた。チューブに乾燥ピリジン50μLを添加し、乾固物を完全に溶解させさらに無水酢酸25μLを加えた後、チューブを密栓し、45℃で45分間静置した。気流下でピリジンと酢酸を完全に揮発させた後、エタノール100μL及びTween-PBS溶液(0.05%Tween-20、140mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.4)900μLを加え、これを定量用試料とした。同様の操作で、NIV、DON、T-2の標品を上記同様処理し、さらに適当濃度となるようTween-PBS溶液で希釈して希釈系列を作製し、スタンダード溶液とした。

【0085】

c) 測定操作

反応用プレートの各ウェルに定量用試料、各スタンダード溶液またはコントロールとしてTween-PBS溶液(0.05%Tween-20, 140mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.4)を50μL/ウェル加え、さらに各ウェルに①KTM-205溶液(300ng/mL, 0.1%BSA加Tween-PBS溶液)、または②KTM-240溶液(300ng/mL, 0.1%BSA加Tween-PBS溶液)、または③KTM-249溶液(300ng/mL, 0.1%BSA加Tween-PBS溶液)、または②と③の等量混合液を50μL/ウェル加え、十分攪拌した後、振とう攪拌しながら室温で45分間反応させた。プレートをTween-PBS溶液で5回洗浄した後、各ウェルに100μL/ウェルのHRP標識-抗マウスイムノグロブリンズーウサギ抗体溶液(300ng/mL, 0.1%BSA加Tween-PBS溶液)を加え、振とう攪拌しながら室温で30分間反応させた。プレートを5回Tween-PBS溶液で洗浄した後、100μLのTMB溶液(インタ

ージエン社)を加え、振とう攪拌しながら室温で30分間暗所反応させ、反応終了後1m○l/L硫酸水溶液をウェル当たり50μL加えて反応を停止し、プレートリーダー(コロナ電気社、MTP-120)で波長450nmの吸光度を測定した。

【0086】

d) 濃度算出

測定結果を以下の式に当てはめ各反応ウェルの阻害率を算出した。コントロール吸光度とは、試料溶液やスタンダード溶液の代わりにTween-PBS溶液(0.05%Tween-20、140mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.4)のみを用いたウェルの吸光度を示す。

【0087】

【数1】

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(\text{コントロール吸光度}) - (\text{各試料吸光度})}{(\text{コントロール吸光度})} \times 100$$

【0088】

スタンダードの濃度を対数でX軸に、それに該当する上記阻害率結果をY軸にとり、検量線を作成した。それぞれの検量線を図1、2、3および4に示す。この検量線を用い、各試料の阻害率結果を検量線に適用し、各試料のそれぞれのトリコテセン系マイコトキシンの濃度を以下の方法で算出した。

NI Vおよびその誘導体の濃度はKTM-205反応ウェルから算出し、NI V、DONおよびそれらの誘導体濃度はKTM-240反応ウェル結果から算出し、DONおよびその誘導体濃度はKTM-240反応ウェル結果からKTM-205反応ウェル結果を減ずることで算出した。T-2およびその誘導体濃度はKTM-249反応ウェル結果より算出した。NI V、DON、T-2およびそれらの誘導体の総濃度はKTM-240反応ウェル結果とKTM-249反応ウェル結果との合計より算出した。

【0089】

実施例4（比較例：GC-MSによる測定）

実施例3で用いた試料と同じサンプル（粉末ムギ）を用いて、GC-MSによるトリコテセン系マイコトキシンの定量を行った。

a) サンプル調製

実施例3で調製した各種粉末ムギサンプル保存溶液 $160\mu\text{L}$ を 1mL 容キャップ付きチューブに取り、気流下で濃縮・乾固し、さらに真空デシケータ内に一昼夜置き、完全に乾固させた。これにトリメチルシリル化剤（N-トリメチルシリルイミダゾール：N, O-ビストリメチルシリルアセトアミド：トリメチルクロロシラン、3:3:2、V/V/V） $25\mu\text{l}$ を加えて密栓し、 50°C で20分間反応した。ついでn-ヘキサン $500\mu\text{l}$ で希釈し、水 $200\mu\text{l}$ で水洗後、n-ヘキサン層 $400\mu\text{l}$ を等量のn-ヘキサンで希釈した。

b) GC-MSによる測定

得られた希釈液をガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS、島津GC-MS-QP2000）にかけ各種トリコテセン系マイコトキシンを定量した。測定条件は以下のとおりであった。

【0090】

キャピラリーカラム（Shimadzu HiCap-CBP1）、カラム温度は 120°C 5分間保持、 280°C まで $8^\circ\text{C}/\text{分}$ 昇温、注入口およびインターフェース温度は 280°C 、イオン源温度は 270°C 、イオン化電圧は 70eV 、スキャン速度（ $35\sim700\text{m/z}$ ）は 1.5scan/sec 、サンプリング速度は 5points/sec 。

c) 測定結果。実施例3との比較

図5に示すように、それぞれの定量値は実施例3で行った本発明利用結果と大変良く一致した。図5は、KTM-240を用いてDONとNIVとを同時に定量した結果とGC-MSでDONとNIVとを別々に定量し、これを合計した結果との相関を示す。

【0091】

【発明の効果】

本発明のモノクローナル抗体を用いて飲食品中のトリコセテン系マイコトキシ

ンを簡便かつ正確に定量検定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】は、KTM-205を用いたトリコテセン系マイコトキシン定量系の検量線を示す。

【図2】は、KTM-240を用いたトリコテセン系マイコトキシン定量系の検量線を示す。

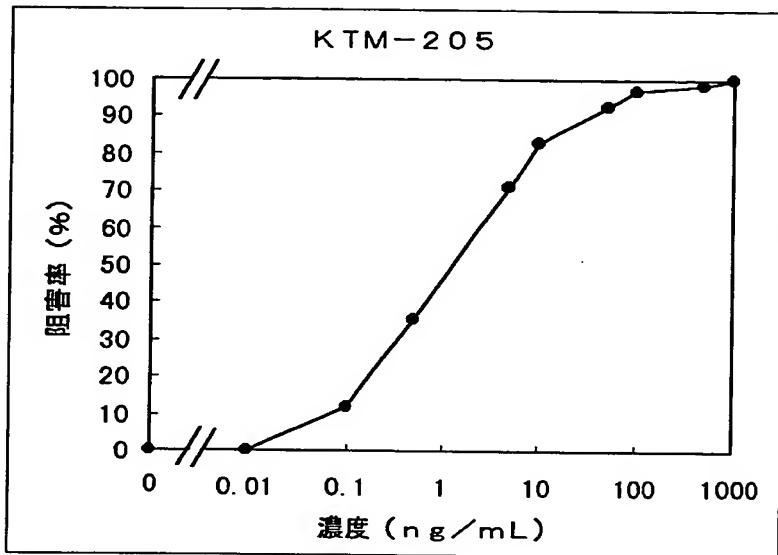
【図3】は、KTM-249を用いたトリコテセン系マイコトキシン定量系の検量線を示す。

【図4】は、KTM-240とKTM-249を用いたトリコテセン系マイコトキシン定量系の検量線を示す。

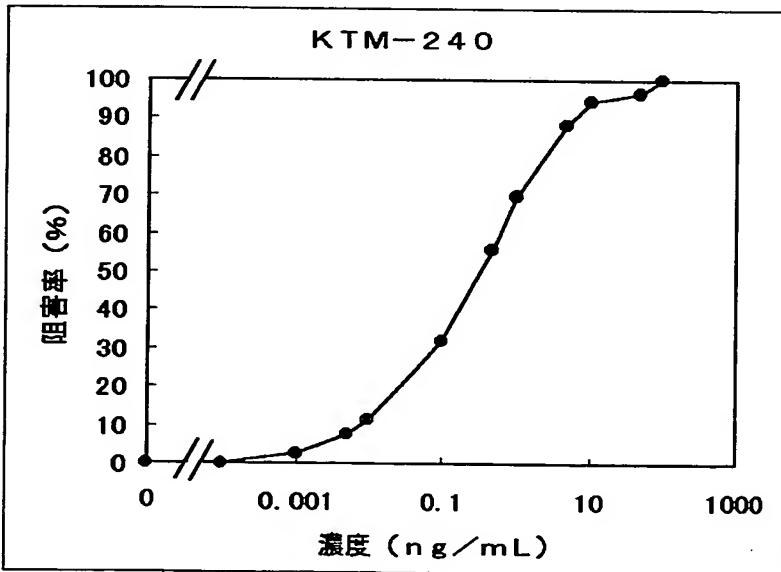
【図5】は、本発明のELISA法によるトリコテセン系マイコトキシンの定量値と同一試料をGC-MSで定量したときの定量値との相関を示す。

【書類名】 図面

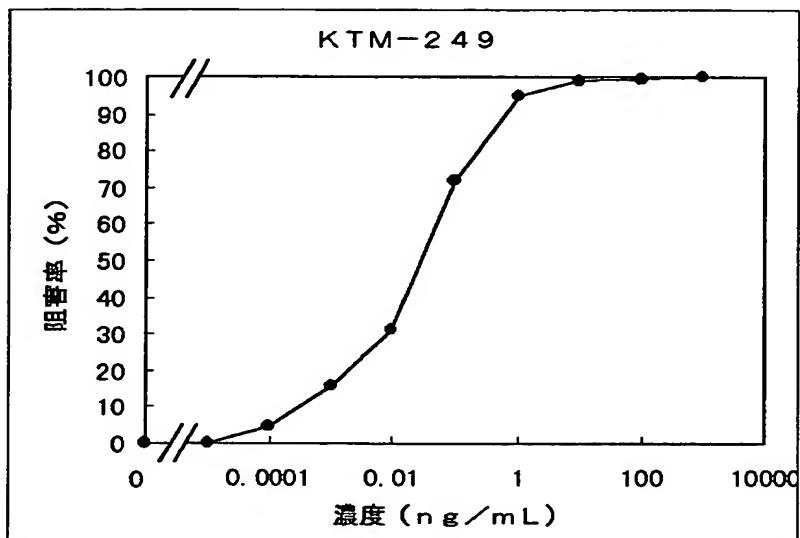
【図1】



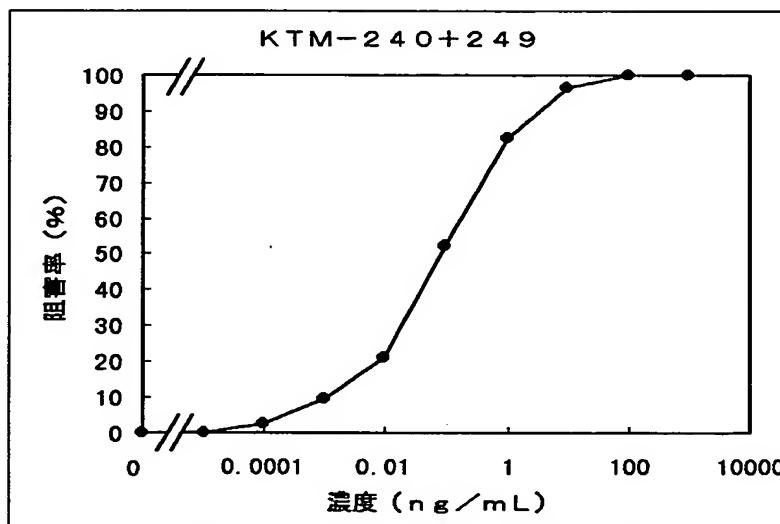
【図2】



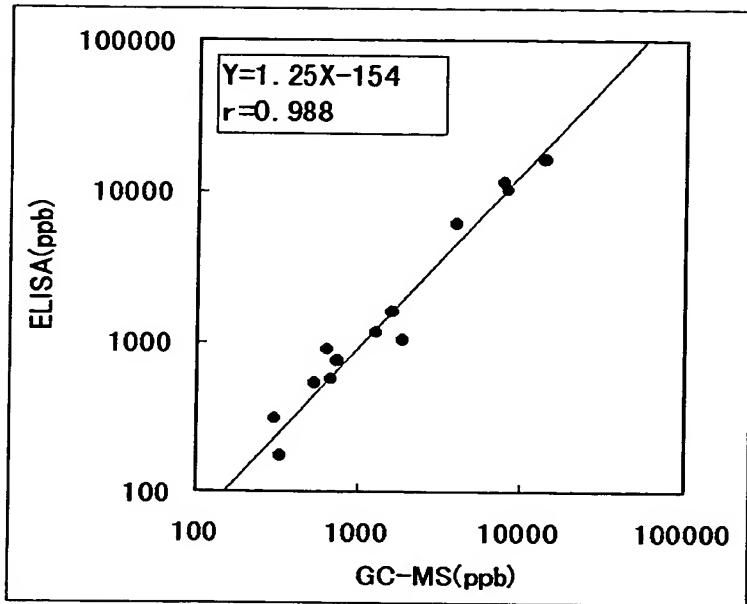
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 トリコテセン系マイコトキシンの免疫学的定量法を提供する。

【解決手段】 トリコテセン系マイコトキシン、DON, NIV, T-2に親和性の高いモノクローナル抗体を創製し、これを用いてトリコテセン系マイコトキシンを包括的に定量する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000162478]

1. 変更年月日 1994年 9月13日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区入船二丁目1番1号

氏 名 協和メテックス株式会社